

Manuel Technique

Maxwell® 16 Blood DNA Purification System

Attention, cartouches à manipuler avec précaution, les bords scellés peuvent être tranchants.







CE

MODE D'EMPLOI DU PRODUIT RÉFÉRENCÉ **AS1015**

IMPRIMÉ AUX ÉTATS-UNIS.. 4/13

Réf. TM301





Maxwell® 16 Blood DNA Purification System

Toute la documentation technique est disponible sur Internet, sur le site : www.promega.com/tbs/
Veuillez consulter ce site Internet pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique. Si vous avez des questions sur l'utilisation de ce système, veuillez contacter les services techniques de Promega. Adresse électronique : techserv@promega.com

1. Utilisation du Maxwell® 16 Blood DNA Purification System

Le système Maxwell® 16 se compose du system de purification d'ADN à partir de sang total Maxwell® 16 Blood DNA Purification System[a] (réf. AS1015) et de l'appareil Maxwell® 16 (réf. AS2050, AS3050). Il permet la purification automatisée de l'ADN à partir d'échantillons de sang total humain ou d'anneau leuco-plaquettaire. Les échantillons de sang prélevés sur EDTA, sur héparine ou sur citrate peuvent être utilisés avec le système Maxwell® 16. La technique de purification des acides nucléiques sur laquelle est basée le système Maxwell® 16 permet d'obtenir de l'ADN directement utilisable pour des analyses en aval par PCR. Ces analyses incluent une variété de tests PCR pour des applications de diagnostic *in vitro* chez l'homme. Le système Maxwell® 16 n'est pas destiné à être utilisé comme test spécifique de diagnostic *in vitro*.

Le Maxwell®16 Blood DNA Purification System est à usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide d'ADN purifié avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.



Limites d'utilisation du produit

Le Maxwell® 16 Blood DNA Purification System (réf. AS1015) n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons de tissu ou des échantillons provenant de liquides biologiques autres que le sang. Il ne doit pas être utilisé avec des échantillons non humains ou pour la purification d'ARN.

Les performances du système Maxwell® 16 ont été évaluées en isolant l'ADN d'échantillons de sang total de 300 µl ou d'échantillons d'anneau leuco-plaquettaire de 250 µl, obtenus chez des individus en bonne santé ayant un nombre de leucocytes allant de $4,2 \times 10^6$ à $1,2 \times 10^7$.

L'utilisateur est tenu d'établir des caractéristiques de performances nécessaires aux applications de diagnostic en aval. Des contrôles appropriés doivent être intégrés à toute application de diagnostic en aval utilisant un ADN purifié à l'aide du système Maxwell® 16.

La conformité à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* a été démontrée pour, et ne s'applique qu'à, l'utilisation de l'appareil Maxwell® 16 (réf. AS2050, AS3050) en mode clinique/IVD avec le Maxwell® 16 Blood DNA Purification System (réf. AS1015).



Protocole de purfication de l’ADN sanguin avec le Maxwell® 16

Le Maxwell® 16 Blood DNA Purification System (réf. AS1015) utilisé avec l'appareil Maxwell 16 automatise la purification d'acides nucléiques jusqu'à 16 échantillons ceci par lyse cellulaire et liaison de l'ADN à des particules de silice magnétisées comme principe de séparation.

Voici les étapes réalisées automatiquement par le système Maxwell® 16 :

- Lyse de l’échantillon en présence d'un agent chaotropique et de détergent.
- Liaison des acides nucléiques aux particules de silice magnétisées.
- Lavages des particules liées à l'ADN de manière à éliminer les autres composants cellulaires.
- Elution des acides nucléiques dans un tampon pouvant être directement ajouté à une PCR standard.

L’utilisateur sélectionne le protocole de traitement approprié indiqué par l’appareil Maxwell® 16, place les échantillons dans les cartouches de réactifs, elles-mêmes introduites sur la plate-forme de l’appareil Maxwell® 16, puis ferme la porte avant de démarrer l’appareil qui réalise automatiquement toutes les étapes du protocole.

La température des échantillons est régulée par un système de chauffage contrôlé par le protocole. L’ADN extrait peut être utilisé pour une amplification par PCR.

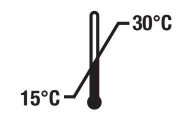


2. Composants du produit, conditions de conservation et légende des symboles

Produit	Conditionnement	Réf.
Maxwell® 16 Blood DNA Purification System	48 préparations	AS1015

Suffisant pour 48 isolations automatisées.







Comprend :

- 48 Cartouches Maxwell® 16 Blood DNA Cartridges
- 50 Plongeurs de purification
- 50 Tubes d'élution
- 20 ml Tampon d'élution

Conditions de conservation : Conserver les kits de purification d'ADN Maxwell® 16 entre 15 et 30 °C. Voir la date de péremption sur l'étiquette du produit. Ne pas utiliser le produit après la date de péremption.



Informations relatives à la sécurité : Les cartouches de réactifs contiennent de l'hydrochlorure de guanidine et du thiocyanate de guanidine qui sont nocifs et irritants. Les cartouches contiennent également de l'éthanol et de l'isopropanol qui sont inflammables.



Les cartouches de réactifs Maxwell® 16 sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent porter une protection appropriée (par ex. des gants et des lunettes étanches) lors de la manipulation de substances infectieuses. Ils doivent respecter les consignes de leur établissement concernant la manipulation et la destruction de toutes les substances infectieuses lorsque celles-ci sont utilisées avec ce système.

Les cartouches de réactifs Maxwell® 16 contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Les utilisateurs doivent porter des gants pour manipuler les cartouches de réactifs. Ils doivent suivre les consignes de leur établissement concernant la destruction.

Pour de plus amples informations sur la sécurité, voir la fiche de données de sécurité, disponible sur **www.promega.com**



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Allemagne

Légende des symboles

Symbole	Explication	Symbole	Explication
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*	EC REP	Représentant agréé
30°C 15°C	Conserver entre 15 et 30 °C.	PROMEGA 2800 Woods Hollow Rd. Madison, WI USA	Fabricant
!	Important	✕	Nocif. Irritant.
Σ <n>	Contient suffisamment pour « n » tests	CE	Conformité européenne
	Avertissement. Risque biologique.		Avertissement. Risque de pincement.
REF	Numéro de catalogue	LOT	Numéro de lot
2	Ne pas réutiliser		



3. Avant de commencer

Matériel devant être fourni par l'utilisateur

- pipettes et embouts de pipette pour le transfert des échantillons dans les cartouches de réactifs préremplies
- tubes de conservation pour les échantillons d'ADN purifié

Tableau 1. Volume d'échantillon de sang total et exigences de prétraitement.

Type d'échantillon	Kit	Volume	Exigences en matière de prétraitement
Sang total humain	Kit de purification d'ADN sanguin (réf. AS1015)	300 µl	Aucune

3.A. Préparation des échantillons de sang total

Capacité de traitement et rendement des échantillons de sang total

Le rendement total de l'ADN génomique issu d'échantillons de sang total dépend du volume de l'échantillon et du nombre de leucocytes/ml. Chaque cartouche fournie dans le Maxwell® 16 Blood DNA Purification System est conçue pour purifier l'ADN génomique à partir de 300 µl de sang total, en considérant un nombre moyen de leucocytes compris entre $4,2 \times 10^6$ et $1,2 \times 10^7$/ml de sang total (valeurs pour un adulte type en bonne santé). Dépasser le volume ou le nombre de cellules recommandé peut avoir un impact négatif sur le rendement et la qualité de l'ADN génomique purifié, et peut aussi entraîner une contamination croisée des échantillons.

Remarques :

1. Les échantillons de sang total collectés dans des tubes traités à l'EDTA, au citrate ou à l'héparine peuvent être utilisés.
2. Les échantillons sanguins doivent être conservés à 4 °C et traités dans les 7 jours suivant leur prélèvement.
3. Lorsque l'utilisateur travaille avec des échantillons concentrés en ADNg, les particules magnesil résiduelles peuvent être éliminées en réalisant une seconde clarification à l'aide du portoir magnétique d'élution ou en centrifugeant l'éluat puis en transferant le surnageant dans un nouveau tube.

3.B. Préparation des échantillons humains d'anneau leuco -plaquettaire

Tableau 2. Volume d'échantillon d' anneau leuco-plaquettaire et exigences de prétraitement.

Type d'échantillon	Kit	Volume	Exigences en matière de prétraitement
Anneau leuco-plaquettaire humaine	Kit de purification d'ADN sanguin (réf. AS1015)	250 µl concentrés à partir de 2,5 ml de sang total	1. Centrifuger le tube Vacutainer® pendant 20 minutes à 2 000 × *g*. 2. Prélever les leucocytes à l'aide d'une pipette de 1 ml. 3. Ajouter l'échantillon dans le puits n°1.

Capacité de traitement et rendement des échantillons d'anneau leuco-plaquettaire

La centrifugation d'un échantillon de sang total à 2 000 × *g* pendant 20 minutes entraîne la séparation du matériel en trois anneaus: une anneau inférieure, contenant principalement des hématies, une anneau supérieure de plasma et une fine anneau blanche à l'interface, enrichie en leucocytes. Une pipette de 1 ml peut être utilisée pour prélever soigneusement les leucocytes (anneau leuco-plaquettaire) à l'interface. En général, on obtient ainsi une concentration dix fois supérieure en leucocytes selon la technique employée par l'utilisateur et la manière dont les leucocytes sont concentrés. Certaines caractéristiques, comme l'ancienneté de l'échantillon et sa conservation, la clarté de l'anneau de plasma et le nombre de leucocytes peuvent affecter la récupération de la fraction de l'anneau leuco-plaquettaire et le rendement en ADN produit.

Un volume de 250 µl d'anneau leuco-plaquettaire (obtenu à partir de 2,5 ml de sang total) peut être traité avec la cartouche Maxwell® 16 Blood DNA Cartridge et la méthode pour l'anneau leuco-plaquettaire.

Remarques :

1. Le volume d'élution est important.

   (!) Placer 300 µl de tampon d'élution dans le tube d'élution Maxwell® 16 lors du traitement d'un échantillon d'anneau leuco-plaquettaire de 250 µl. Du tampon d'élution sera perdu au cours du cycle à cause de l'évaporation et de l'humidification des particules MagneSil® pendant l'élution.

2. Lorsque l'utilisateur travaille avec des échantillons concentrés en ADNg, les particules magnesil résiduelles peuvent être éliminées en réalisant une seconde clarification à l'aide du portoir magnétique d'élution ou en centrifugeant l'éluat puis en transferant le surnageant dans un nouveau tube.

3. La concentration de l'ADN purifié doit être mesurée par absorption à A_{260}.
   La pureté de l'ADN doit être confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose et en mesurant le rapport A_{260}/A_{280} qui est en général >1,7.

4. Des contrôles appropriés doivent être intégrés aux applications de diagnostic en aval utilisant un ADN purifié à l'aide du système Maxwell® 16.

5. Pendant l'évaluation des performances, il a été démontré que le transfert d'ADN entre cartouches est <6 pg/µl. L'utilisateur est tenu d'établir des caractéristiques de performances nécessaires aux applications de diagnostic en aval.



3.C. Préparation des cartouches Maxwell® 16

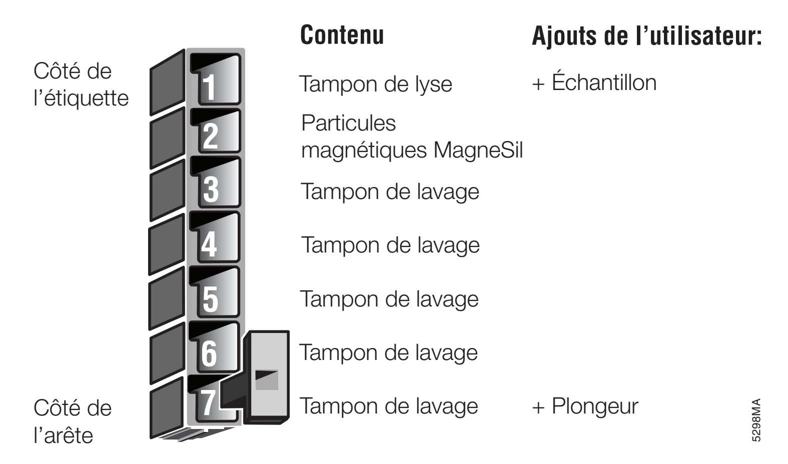
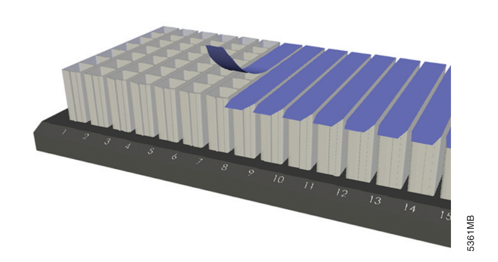
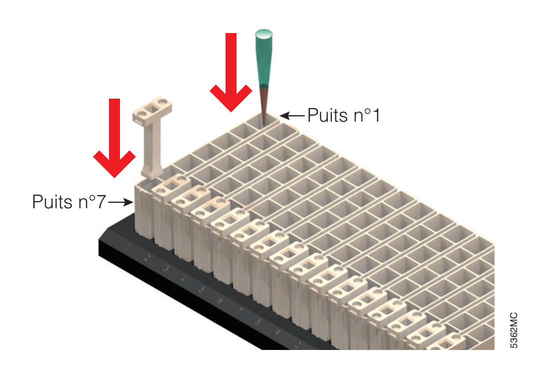


Figure 1. Cartouche du kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification System. L'échantillon est ajouté dans le puits n°1.

Suivre les procédures de laboratoire standard pour éviter toute contamination croisée des échantillons. Porter des gants et les changer régulièrement. Utiliser des embouts résistants aux aérosols lors du transfert des échantillons pour limiter le risque de contamination croisée. Ne pas utiliser les cartouches si leurs languettes de fermeture sont endommagées ou absentes.



1. Placer chaque cartouche à utiliser dans le portoir pour cartouches Maxwell® 16, le côté à arête de la cartouche étant orienté vers le côté numéroté du portoir. Retirer soigneusement la languette de chaque cartouche. Veiller à éviter toute contamination des réactifs lors du retrait de la languette.



2. Placer un plongeur dans le puits n°7 de chaque cartouche, en s'assurant que la partie inférieure du plongeur se trouve au fond de la cartouche (le puits n°7 est le plus proche du côté de l'arête de la cartouche).

   Remarque : Le plongeur s'insère facilement dans la cartouche.

3. Transférer l'échantillon dans le puits n°1 (le plus proche de l'étiquette de la cartouche et le plus éloigné de l'utilisateur). Veiller à éviter toute contamination des échantillons durant le transfert et à garantir qu'ils sont correctement identifiés et suivis.



Les cartouches de réactifs Maxwell® 16 sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent porter une protection appropriée (par ex. des gants et des lunettes étanches) lors de la manipulation de substances infectieuses. Ils doivent respecter les consignes de leur établissement concernant la manipulation et la destruction de toutes les substances infectieuses lorsque celles-ci sont utilisées avec ce système.



Les cartouches de réactifs Maxwell® 16 contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Les utilisateurs doivent porter des gants pour manipuler les cartouches de réactifs. Ils doivent suivre les consignes de leur établissement concernant la destruction.



Les tubes d'élution bleus seront utilisés ultérieurement lors du processus de configuration.



4. Purification automatisée de l’ADN sur l’appareil Maxwell® 16

4.A. Purification utilisant l’appareil Maxwell® 16 IVD (réf. AS3050)

Voir le *Manuel technique de l’appareil Maxwell® 16 IVD* numéro TM315 pour obtenir des informations détaillées sur la mise en place et l'exécution de l'appareil Maxwell® 16 IVD.

1. Mettez l’appareil Maxwell® 16 IVD en marche. L’appareil va démarrer, afficher le numéro de version du logiciel, réaliser une vérification automatique et mettre en position toutes les pièces mobiles.
2. Vérifiez que l’écran d’accueil indique bien « SEV » et que le matériel SEV est présent. Appuyez sur « Run/Stop » (Marche/Arrêt) pour continuer.
3. Saisir le PIN de l’utilisateur, si cette option est disponible.
4. À l’écran des Protocoles, sélectionnez « Sang» ou « Couche leucocytaire».
5. À l’écran suivant, vérifiez que la méthode et l’utilisateur sont correctement sélectionnés. Sélectionnez « Marche/Arrêt » pour continuer.



6. Ouvrez la porte au moment indiqué à l’écran, puis sélectionnez « Run/Stop ».

   Avertissement : risque de pincement.
7. Voir le *Manuel technique de l’appareil Maxwell® 16 IVD* numéro TM315 pour obtenir des instructions pour les entrées du lecteur de code-barres si cette option est activée.



8. Transférer les cartouches contenant les échantillons et les plongeurs du portoir de préparation des cartouches sur la plate-forme du Maxwell® 16. S’assurer que les cartouches sont placées dans l’appareil avec le côté à arête de la cartouche au plus près de la porte.

   Remarques :

   En cas de difficulté à insérer la cartouche dans la plate-forme, vérifier l’orientation de la cartouche.

   Insérer la cartouche en commençant par le côté à arête, puis en appuyant sur l’arrière de celle-ci pour qu’elle s’encliquette en place.

   Si l’utilisateur traite moins de 16 échantillons, centrer les cartouches de réactifs sur la plate-forme en les espaçant régulièrement à partir du centre.
9. Placer un tube d’élution bleu pour chaque cartouche dans les emplacements pour tubes d’élution, à l’avant de la plate-forme.
10. Ajouter 300 µl de tampon d’élution dans chaque tube d’élution bleu.

11. Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Marche/Arrêt). La plate-forme se rétracte. Fermer la porte.



Avertissement : Risque de pincement.

L'appareil Maxwell® 16 IVD commencera immédiatement le cycle de purification. L'écran affichera le temps approximatif restant dans le cycle.

Remarques :

1. Appuyer sur le bouton « Run/Stop » ou ouvrir la porte fait marquer une pause au cycle.
2. Si le cycle est abandonné avant la fin, l'appareil libèrera les particules des plongeurs et éjectera ces derniers dans le puits n° 7 de la cartouche. Les échantillons seront perdus.

12. Une fois que la purification automatisée est terminée, suivez les instructions à l'écran pour le transfert des données. Pour des instructions détaillées, consultez le *Manuel technique de l'appareil Maxwell® 16 IVD, numéro* TM315 et le *Manuel technique du logiciel Maxwell® Sample Track, numéro* TM314.

13. À la fin de la méthode, suivez les instructions à l'écran pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont placés dans le puits n° 7 de la cartouche à la fin du cycle. Si les plongeurs n'ont pas été retirés de la tige magnétique, retirez-les doucement à la main en poussant dessus.

14. Appuyez sur « Run/Stop » pour faire sortir la plate-forme de l'appareil.



Avertissement : risque de pincement.

15. Retirer les tubes d'élution des emplacements pour tubes d'élution chauffés et les placer sur le portoir magnétique des tubes d'élution. Transférer les échantillons élués dans des tubes de conservation par pipetage. Jeter les tubes d'élution bleus après avoir transféré l'échantillon élué.

Remarque : Afin d'éviter tout transfert de particules, utiliser un embout de pipette pour aspirer les échantillons et les séparer des particules capturées sur le côté du tube d'élution bleu.



16. Retirer les cartouches et les plongeurs de la plate-forme de l'appareil et les jeter.

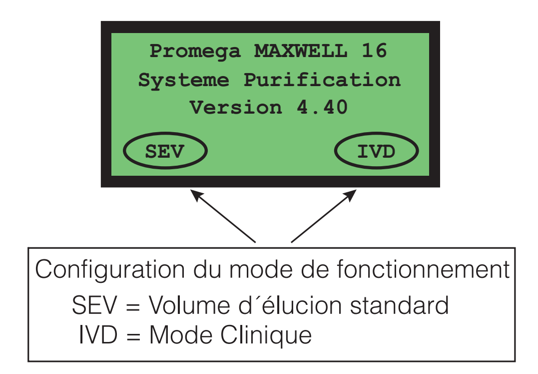


Ne pas réutiliser les cartouches de réactifs, les plongeurs ou les tubes d'élution.

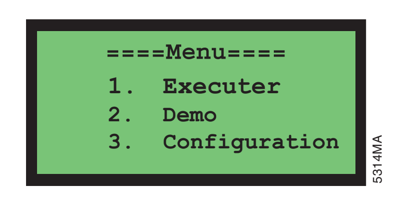
Si vous avez configuré votre appareil pour qu'il effectue un traitement aux rayons UV à la fin de chaque extraction, ce traitement débutera quand la porte sera fermée. Assurez-vous que les échantillons sont retirés de l'appareil avant le traitement aux UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques.



4.B. Purification utilisant l'appareil Maxwell® 16 pour les applications clinique (réf. AS2050)



1. Le système Maxwell® 16 est capable d'exécuter des méthodes de recherche et de police scientifique, ainsi que la méthode clinique. Avant utilisation, vérifier que l'appareil est réglé sur le mode clinique. Procéder en fermant la porte et en mettant l'appareil Maxwell® 16 hors tension puis de nouveau sous tension. Le numéro de version du logiciel et la configuration du mode s'affichent comme illustré. Si l'écran est différent de celui présenté ci-dessus, se reporter au manuel d'utilisation (réf. TM300) de l'appareil *Maxwell® 16* pour obtenir des instructions de réinitialisation de l'appareil en mode clinique.

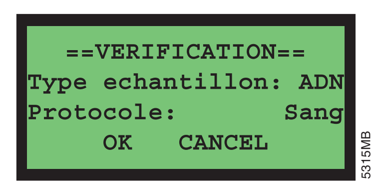


2. Afin de réaliser un cycle de purification, utiliser l'un des boutons de défilement pour déplacer le curseur sur « Exécuter ». Appuyer sur « Run/Stop » (Exécuter/Arrêter) pour effectuer la sélection.

   Remarque : « Demo » est un cycle de purification rapide utilisé à des fins de démonstration. « Configuration » sert à modifier le mode de fonctionnement de l'appareil et n'est pas requis pour cette procédure.

3. Utiliser l'un des boutons de défilement pour déplacer le curseur sur le type de protocole/échantillon requis. Appuyer sur « Run/Stop » (Marche/Arrêt) pour effectuer la sélection.





4. Vérifier que le protocole sélectionné est le bon. Utiliser l'un des boutons de défilement pour déplacer le curseur sur « OK ».

   Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Marche/Arrêt) pour continuer avec un cycle de purification. Sélectionner « Cancel » (Annuler) si les informations affichées sont incorrectes.

5. Ouvrir la porte lorsque le système le demande sur l'écran LCD. Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Exécuter/Arrêter) pour faire sortir la plate-forme de l'appareil et ainsi insérer les cartouches facilement.



   Avertissement : Risque de pincement.



6. Transférer les cartouches contenant les échantillons et les plongeurs du portoir de préparation des cartouches sur la plate-forme du Maxwell® 16. **S'assurer que les cartouches sont placées dans l'appareil avec le côté à arête de la cartouche au plus près de la porte.**

   Remarques :

   En cas de difficulté à insérer la cartouche dans la plate-forme, vérifier l'orientation de la cartouche.

   Insérer la cartouche en commençant par le côté à arête, puis en appuyant sur l'arrière de celle-ci pour qu'elle s'encliquette en place.

   Si l'utilisateur traite moins de 16 échantillons, centrer les cartouches de réactifs sur la plate-forme en les espaçant régulièrement à partir du centre

7. Placer un tube d'élution bleu pour chaque cartouche dans les emplacements pour tubes d'élution, à l'avant de la plate-forme.

8. Ajouter 300 µl de tampon d'élution dans chaque tube d'élution bleu.



4.B. Purification utilisant l'appareil Maxwell® 16 pour les applications clinique (réf. AS2050) (suite)

9. Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Exécuter/Arrêter). La plate-forme se rétracte. Fermer la porte.



Avertissement : Risque de pincement..

10. L'appareil Maxwell® 16 commence le cycle de purification. L'écran LCD affiche les étapes réalisées, ainsi que le temps approximatif restant dans le cycle.

Remarques :

Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Exécuter/Arrêter) ou ouvrir la porte fait marquer une pause au cycle. Fermer la porte (si elle est ouverte) et sélectionner de « continuer » ou de « terminer » le cycle.

Si l'utilisateur interrompt le cycle avant la fin de celui-ci, l'appareil élimine les particules des plongeurs et retire ces derniers dans le puits n°7 de la cartouche ; **l'échantillon est perdu.**

Pour obtenir des instructions sur la récupération d'un échantillon après une panne de courant temporaire, se reporter à la section Dépannage du *manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® 16* (réf. TM300)..

11. Une fois la purification terminée, l'écran LCD affiche un message indiquant que la méthode est terminée.

Ensuite, ouvrir la porte de l'appareil. Vérifier que tous les plongeurs ont été retirés de l'ensemble de tiges magnétiques. Dans le cas contraire, appuyer doucement dessus à la main pour les retirer.

12. Appuyer sur le bouton « Run/Stop » (Exécuter/Arrêter) pour faire sortir la plate-forme de l'appareil.

13. Retirer les tubes d'élution des emplacements pour tubes d'élution chauffés et les placer sur le portoir magnétique des tubes d'élution. Transférer les échantillons élués dans des tubes de conservation par pipetage. Jeter les tubes d'élution bleus après avoir transféré l'échantillon élué.

Remarque : Afin d'éviter tout transfert de particules, utiliser un embout de pipette pour aspirer les échantillons et les séparer des particules capturées sur le côté du tube d'élution bleu.



14. Retirer les cartouches et les plongeurs de la plate-forme de l'appareil et les jeter. Ne **pas** réutiliser les cartouches de réactifs, les plongeurs ou les tubes d'élution.





5. Dépannage

Pour les questions qui n’ont pas été traitées ici, veuillez contacter une succursale ou un distributeur Promega local. Coordonnées disponibles sur le site : **www.promega.com**. Adresse électronique : **techserv@promega.com**

Symptômes	Causes et commentaires
Inférieur au A_{260} prévu (inférieur au rendement prévu)	L’échantillon de sang total présentait un nombre de leucocytes faible. Le rendement de l’ADN génomique issu d’échantillons de sang total dépend du nombre de leucocytes présents dans l’échantillon.
	L’échantillon de sang total n’a pas été mélangé avant traitement. Veiller à mélanger les échantillons de sang total avant leur traitement pour s’assurer que les leucocytes sont en suspension.
	Quantitée traitée d'échantillon trop importante. Traiter une quantité d’échantillon supérieure à la quantité recommandée n’augmente pas systématiquement les rendements. Dépasser la quantité limite d’échantillon peut entraîner un rendement sous-optimal et une pureté réduite de l’ADN.
Aucun rendement	Les échantillons ont été placés dans le puits n°7 au lieu du puits n°1 de la cartouche de purification d’ADN. S’assurer que la cartouche de purification d’ADN est dans le bon sens pour que l’utilisateur ajoute l’échantillon dans le puits n°1 (le plus proche du côté étiqueté de la cartouche).
Transfert de particules	L’ADN purifié issu d’échantillons comportant un grand nombre de leucocytes peut devenir visqueux et être difficile à retirer pendant l’élution. Réaliser une seconde capture des particules à l’aide du portoir magnétique pour élution ou éliminer les particules par centrifugation.



[a]U.S. Pat. Nos. 6,027,945, 6,368,800 and 6,673,631, European Pat. No. 1 204 741 and Japanese Pat. No. 4425513.